

PROSJEKTOPPGAVE:

PEPTIDENDRINGER I URINEN TIL SCHIZOFRENE PASIENTER

SKREVET AV:

**NADIA BEGUM MOHAMMAD
STUD.MED H02**

VEILEDER:

**DR. KARL LUDVIG REICHELT
PEDIATRISK FORSKNINGS INSTITUTT RH**

Abstracts:

The project is based on Dohans Hypothesis from 1966, where he suggests a possible relationship between food intolerance and Schizophrenia. We wanted to find out whether the concentration of peptides is elevated in urine from untreated Schizophrenic patients compared to the normal population. And if that is correct, is there any correlation between the peptide-concentration in the urine or individual peaks and severity of the disease. We also want to find out if there are some specific peptides which are elevated that would correlate with symptoms. We used data from 96 presumed healthy persons as standard of reference, and data from ten patients. Nine were Schizophrenic, and one was Schizoaffective. To analyse the urines, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) was performed. This first result was that the urine sample from the schizoaffective patient differed visible from rest of the samples; it had noticeable late peptide-peaks which were not found neither among the Schizophrenic, nor the normal samples. The total concentration of peptides is elevated in urine samples from the drug free Schizophrenic patients. A tendency for a correlation between the total concentration and severity of the disease was found. The different peptide-peaks gave different results. Some of the peaks are not significantly different from controls. Other peaks are present in both groups, but are much larger in the patient group. Yet another type of peaks is only present among the patients. It turns out that it is difficult to compare peptide-peaks with symptoms because the number of patients is too low, and both peptide-peaks and symptoms appear to be overlapping among the patients.

INNLEDNING

Utgangspunktet for prosjektoppgaven er Dohans hypotese fra 1966, der han i artikkelen "Cereals and Schizophrenia, Data and Hypotheses" foreslår en mulig sammenheng mellom matintoleranse og Schizofreni. Han legger til grunn data fra forskjellige land om forbruk av kornvarer, spesielt hvete og rug, og forekomsten av Schizofreni. I artikkelen viser han en mulig korrelasjon mellom forekomsten av Schizofreni og forbruket av spesielt hvete, ved å legge til grunn følgende argumenter;

- I de land hvor forbruket er høyt, er forekomsten av Schizofreni høy.
- Når forbruket øker eller minker, f.eks. i krigstider, så henholdsvis øker eller minker forekomsten av Schizofreni også.
- Selv innen landegrenser varierer risikoen for å utvikle Schizofreni fra gruppe til gruppe, og det viser seg at den er høyere i folkegrupper hvor inntak av hvete er større.
- Muligheten for en sammenheng mellom cøliaki og Schizofreni finnes fordi
 - o Schizofrene pasienter har oftere en sykehistorie med barne-cøliaki enn normalbefolkningen
 - o Psykoser forekommer oftere hos voksne med cøliaki sammenlignet med resten av befolkningen
 - o Atferdsendringer forekommer hos både barn og voksne med cøliaki, og disse atferdsendringene kan fremkalles ved å spise hvete, og lettes ved glutenfri diett.
 - o Forverring av cøliaki kan fremprovoseres av psykisk stress og infeksjoner; situasjoner som også fører til forverring av Schizofreni. Selv om dette kan være som følge av uavhengige mekanismer, er det en mulighet for at det er forverring av Cøliaki som igjen fører til forverringen av den Schizofrene lidelsen.

Etter at hypotesen først ble framsatt, ble det gjort mye arbeid for å finne ut om det virkelig er variasjoner i forekomst og risiko av Schizofreni. Dette er veldig fint oppsummert i "Cereals and Schizophrenia" (Lorenz, K. 1990). Her er det framsatt en overbevisende mengde data fra alle verdensdelene, og forfatteren kommer frem til at de fleste studiene støtter hypotesene til Dohan.

Forskningsgrupper har regnet ut at risikoen for Schizofreni ved cøliaki er ca. 3 ganger større enn risikoen for Schizofreni i normalbefolkningen (Lorenz, K. 1990, Eaton W. og medarbeidere 2004)

Schizofreni viser seg å ha en betydelig genetisk komponent (Kendler og Dielh 1993, Onstad og medarbeidere 1991) og en miljøavhengig variabel komponent (Eagles 1991, Kringlen E. 1964, Kringlen E. og Cramer G 1989), påvist bla. ved familie-, tvilling-, adopsjons og migrasjonsstudier. Det er hittil uvisst hva de miljømessige variabler kan være. Flere faktorer er foreslått; psykososiale forhold, virale infeksjoner, prenatal- eller natal komplikasjoner og mutasjoner.

Dohan foreslår at det kan være felles gener som disponerer for Cøliaki og Schizofreni. Man kan tenke seg at dette er et tilfeldig uttrykk for at disse to lidelsene er polygene, og har noen felles disponerende gener. Studier av kornforbruk, Schizofreniforekomst og overlapp av Schizofreni- og Cøliakidiagnosene, tyder midlertidig mer på at det ikke er kun genetikken som gir overlapp av diagnosene. Det er mer sannsynlig at det i tillegg til noen felles disponerende gener, er utsettelse for noen felles miljøfaktorer som bestemmer om disse disponerende genene kommer til uttrykk. I denne tankerekken følger videre at konsum av kornvarer er en av de fellesfaktorene i omgivelsen som kan føre til det fenotypiske uttrykket av disse genene. Enten kan dette forklares med at kornvarer utløser hver av de lidelsene via egne selvstendige mekanismer for hver. Eller så kan det forklares med at kornvarer fører til

økt tarmopptak av peptider, enten pga Cøliaki som opprinnelig foreslått, eller via andre lignende mekanismer, og at dette igjen fører til endringer inne i kroppen som videre fører til Schizofreni hvis man har en genotype som gjør en sårbar for disse endringene.

Hva er så sammenhengen mellom hypotesen til Dohan og peptidkonsentrasjon i urinen?

Økt konsentrasjon av peptider i urinen er påvist både hos pasienter med Schizofreni og Cøliaki. Mest sannsynlig er dette uttrykk for økt konsentrasjon av peptider i serum hos pasientene. Man tenker seg videre at peptidene spiller en rolle for uttrykket av symptomer ved begge diagnoser., ettersom de peptider som er isolert har vist bio-aktiviteter.

Hypotesens validitet for Schizofreni har vært utprøvd på forskjellige måter, hvor ulike studier har fokusert på ulike aspekter av den. Det finnes en nærmest uoverkommelig mengde litteratur som omhandler hypotesen på en veldig bred basis, og utforsker de ulike påstander som kunne utledes fra den. Jeg har begrenset meg til noen få spørsmål som gir perspektiv nok til å forstå sammenhengen mellom Schizofreni og økt mengde peptider i urinen:

- Er det økte konsentrasjon av peptider i urinen til pasientene?
- Hvilke peptider er dette?
- Hvor kommer de fra?
- Når disse sentralnervesystemet (SNS) / bryter de Blod–Hjerne-Barrieren (BHB)?
- Affiserer de SNS?
- Via hvilke mekanismer påvirker de SNS?
- Hvilke symptomer forårsaker de?
- Fjerner fravær av disse symptomer hos pasientene?

Er det økt konsentrasjon av peptider i urinen til pasientene?

Det viser seg at det er økt konsentrasjon av peptider i urinen til både pasienter med Schizofreni og Cøliaki. Ved Sephadex-filtrasjon finner man at på grunnlag av peptidmønsteret kan Schizofreni pasientene inndeles i flere sub-grupper. Cade og medarbeidere meddeler i 2000 at de etter undersøkelse av urinen til 120 Schizofrene pasienter, fant ut at de i likhet med kontrollgruppen kunne inndeles i tre ulike grupper. Prosentfordelingen av pasienter i de ulike gruppene var lik normalbefolkningen. Det som skilte seg ut hos Schizofrenipasientene var høyden på toppene; de hadde signifikant høyere peptid-topper!

Hole og medarbeidere fant i 1979 et spesifikt biologisk aktivt stoff av opioid natur, som de kalte faktor 3b2, i urinen til Schizofrene pasienter. Selv om de ikke utelukker at stoffet kan finnes i urinen til friske, mener forfatterne at det helt klart må være i mindre mengder, da den samme biologiske aktiviteten ikke ble observert hos disse.

Opioid peptider i plasma og urin til Schizofrene pasienter er bekreftet uavhengig (Drysdale og medarbeidere 1982; Idet og medarbeidere 1982) samt i serum og cerebrospinalvæske (Lindstrøm og medarbeidere 1986).

Hvilke peptider er dette?

Ved HPLC-separasjon av urinen til pasientene er det forekomsten av disse tre peptider som er spesielt interessant: Gliadinomorfine 1989, β -casomorfine og Indolyl-3-acryloylglycine (IAG) (Cade og medarbeidere 2000). Disse er produkter fra henholdsvis gluten i kornvarer, casein i melk, og Tryptofan nedbryting i tarmen. Forekomsten av IAG er spesielt interessant fordi den trolig kan medvirke til å øke tarm permeabiliteten.

Hvor kommer de fra?

Man regner med at peptidene har sin opprinnelse i tarmlumen. Dette er peptider som finnes i tarmlumen også hos friske. Hos Schizofrene og Cøliakipasienter er det vist at større mengder

finnes i urin, sannsynligvis fordi større mengder går over fra tarmlumen til blod. Det kan være flere grunner til at dette skjer. En mulighet er ufullstendig nedbrytingsmekanismer; som igjen kan komme av at de nedbrytende enzymene enten mangler, finnes i inadekvate mengder, eller deres aktivitet er hemmet (Mahe og medarbeidere 1989). En annen forklaring har vært at det er økt permeabilitet i tarmen enten pga mucosa hos pasientene naturlig er annerledes, eller at den får økt permeabilitet pga IgA-medierte endringer. (Wood og medarbeidere 1987).

Videre vil økt nivå av IgA- og IgG- antistoffer mot matantigener (Cade og medarbeidere 2000; Reichelt og Landmark 1995) peke på økt protein opptak via mucosa, utover det normale opptak (Husby og medarbeidere 1985; Axelsson og medarbeidere 1986) Her kan det ligge en mulig forklaring på hvorfor Schizofreni forekommer oftere ved Cøliaki; Cøliaki gir økt permeabilitet over tarmen, fordi tarmepitelet blir skadet. Dermed kan flere og større molekyler passere over i blod. Disse påvirker igjen SNS, slik at man får fremkalt Schizofreni-symptomer.

Når disse (SNS) / bryter de (BHB)?

Vi har generelt flere eksempler på at molekyler krysser over BHB og inn i SNS, bla IgG, albumin, botulinium toxin. BHB kan påvirkes av en rekke faktorer, bla transmitter serotonin og enkefalin. Direkte opptak av casomorfin er vist (Ermisch og medarbeidere 1983) I en undersøkelse (Sun og medarbeidere 1999) som er gjort spesielt for å vise at dette er tilfelle ved Schizofreni sprøyter man inn β -casomorfin i blodårene på rotter. Etter en time blir rottene likvidert, og deres hjerne tatt ut. Man finner at allerede etter en time har infusjonen ført til effekter i SNS. Det er godt mulig at det ikke er β -casomorfin, men nedbrytningsprodukter fra dette som kommer over BHB. Altså, selv om mekanismen er uklar, kan man likevel si sikkert at β -casomorfin kan gi effekter over BHB, dvs i SNS.

Affiserer de SNS?

Hole og medarbeider (1979) sprøytet inn en rensset fraksjon av 3b2 fra 7 pasienturiner, intracerebroventrikulært hos rotter. Dette ga atferdsendringer, endring av kroppstemperatur, toleranseutvikling for morfin, analgesi og inhiberende effekt på Dopamin og serotonin reopptak i hypotalamiske-, striatale- og til en viss grad også i hippocampus- synapser.

Drysdale og medarbeidere viste også i 1982 at infusjon av plasma, med peptider, inn i laterale ventrikel hos rotter gir atferdsendringer. Han brukte plasma fra 10 kronisk Schizofrene pasienter, og fra en kontrollgruppe på 10 sannsynligvis friske sykehusansatte. Det viste seg at infusjon av plasma fra begge grupper ga atferdsendringer hos rottene. Det oppsiktsvekkende var at atferdsendringene var større og varte mye lengre; da effekten av plasma fra friske personer ga atferdsendringer i 30-45 minutter, varte de i opptil 2 uker med plasma fra Schizofrene!

Undersøkelsen til Sun og medarbeidere viser også at peptider helt klart gir effekter i SNS. Man fordeler rottene i flere grupper som får β -casomorfin i ulike doser. Samt har man en "placebo"-gruppe som bare får NaCl. Man observerer Fos-lignende immunreaktivitet i visse hjerne regioner etter at hjernene er tatt ut. C-Fos er et gen som aktiveres tidlig ved stimulering, og kan fungere som en markør for nevronal aktivitet. "Placebo"- gruppen viste ikke noe økt Fos-aktivitet. I de andre gruppene øker Fos-aktivitet med økende dose. Spesielt interessant er det, at de hjerneområdene man regner med er involvert i psykoser, som Nucleus Accumbens, viser seg å få induert Fos-aktivitet ved infusjon av β -casomorfin. I en annen undersøkelse fant samme forfattere at β -casomorfin også gir atferdsendringer hos rotter, samt viser også disse at peptidet har en analgetisk effekt.

Man regner med at alle disse endringene påvist via disse undersøkelsene nødvendigvis må komme via affeksjon av SNS!

Via hvilke mekanismer påvirker de SNS?

Alle de tre ovenforstående gruppene har poengtert ut den analgetiske effekten av henholdsvis β -casomorfin og plasma fra Schizofrene pasienter. Hole og medarbeidere (1979) og Sun og medarbeidere (1999) fant at henholdsvis faktor 3b2 og β -casomorfin virket analgetisk på rottene. Naloxon innsprøyting førte til en sterk demping av denne analgetiske effekten, samtidig med at atferdsendringene i undersøkelsen til Hole og Fos-aktiveringen i undersøkelsen til Sun ble sterkt hemmet.

Drysdale og medarbeidere fant at plasmaet virket analgetisk på 8 av 10 rotter, mens de resterende to fikk en lavere smerteterskel! Dette tydet på en at noe i plasmaet interagerer med opioidreseptorer. De fant ut at tilførsel av plasmaet til en "opioid-reseptor binding assay", ville hindre at Naloxon bandt seg til opioid-reseptorene i plasmaet.

Hole finner også en tydelig, selv om ikke absolutt, kross-toleranse-utvikling mellom 3b2 og morfin, for den analgetiske effekten.

Alle funnene tyder på at de sentrale effektene av peptidene kan komme av interaksjon med opioidreseptorer.

Hole og medarbeidere (1979) viser at Dopamin- og Serotonin- reopptak i hypotalamiske-, striatale- og til en viss grad også i hippocampale- synapser nedsettes via 3b2. Videre at innsprøyting av Haloperidol nedsetter den analgetiske effekten og atferdsendringene, men øker de katalpsi-lignende tendensene hos rottene. Undersøkelsen viser en sterk sammenheng mellom endringer i dopaminerge synapser og 3b2, slik vi også ville forvente utifra dagens behandlingsregime for Schizofreni! Samt viser den en svakere sammenheng mellom Serotoninerge synapser og 3b2.

En annen mulig forklaring er at de immunologiske forandringene som kommer av at fremmede peptider sirkulerer i kroppen. Blå er det påvist at IgA antistoffer fra pasienter med Cøliaki reagerer sterkt med blodårer i hjernen (Pratesi og medarbeidere 1998). Siden mange av de Schizofrene pasientene også har økte mengder av dette, kan man lett tenke seg at slike mekanismer er involvert i etiologien.

Hvilke symptomer forårsaker de?

Rottforsøkene med urin faktor (Hole og medarbeidere 1979), med plasma (Drysdale og medarbeidere 1982) og β -casomorfin (Sun og medarbeidere 1999) viste atferdsendringer hos rottene. Atferden de viser er noe lignende i begge forsøk. Man observerer perioder med hypoaktivitet, distansering fra andre rotter, lite påvirkning av ytre stimuli; taktil, hørsels eller syn. Det ble observert repetativ atferd, for eksempel der rottene gikk i sirkler. Denne atferden var vanskelig å avbryte, og rottene evnet ikke engang å se hindringer som ble plassert i veien for dem. Perioder med uro, hyperaktivitet, eksplosiv motorisk aktivitet ved berøring ble sett. Rottene endte med en mer rolig, men abnormal atferd, der de ble sittende i et hjørne av buret, med ansiktet inn i et hjørne. Analgesi og uvanlige positurer forekom. Sun og medarbeidere viste at endringene var doseanhengige, og opioid antagonist Naloxon reduserte effektene.

Noen av atferdsendringene i begge forsøk minner om typiske symptomer hos Schizofrene pasienter; autisme, repetativ atferd, katatoni.

Fjerner fravær av peptidene symptomer hos pasientene?

Hvis disse peptidene forårsaker noe av symptomene ved Schizofreni, må nødvendigvis fravær av peptidene føre til fravær av symptomene, forutsatt av at pasientene ikke har vært utsatt for peptidene, eller for medikamenter, over så lang tid at det har ført til kroniske forandringer i SNS. Flere grupper har brukt glutenfri- / melkefri-diett og/eller dialyse til å oppnå fravær av disse proteiner i serum. I undersøkelsene bruker de ofte peptidforekomsten i urin som mål på peptider i serum. I "Autism and Schizophrenia" (Cade og medarbeidere 1999) undersøkte man 120 Schizofreni pasienter. Ved siden av å vise at de har økte peptider i urinen, viser de at diett minsker disse peptidene og symptomene! Ved bruk av dialyse, i tillegg til diett, viser pasientene enda større tendens til bedring. En viktig observasjon var også at de ulike subgrupper av pasienter viste noe ulik respons; en av de tre gruppene viste så merkverdig rask og sterk respons på dialyse at diett ikke ble nødvendig, mens de to andre gruppene viste respons over tid ved dialyse, og responsen ble forsterket ved diett.

Angående litteraturvalget må det sies at i denne oppsummeringen er det lagt mest vekt på litteratur som støtter Dohans hypotese. Selv om en mengde litteratur støtter hypotesen, finnes det også litteratur som svekker den. Bla. Aetiology of Schizophrenia (Crow 1994) som mener at det ikke finnes geografiske/ kulturelle forskjeller i forekomsten av Schizofreni. Wood og medarbeidere som i undersøkelsen sin viser at det er økt permeabilitet over tarmen hos en del Schizofreni pasienter, finner samtidig at ingen av pasientene har histologiske forandringer i tarmen, slik en skulle tro de ville ha hvis de hadde okkult Cøliaki.

I tillegg er det flere usikkerhetsmomenter knyttet til alle undersøkelsene som omhandler hypotesen. Dermed gir ingen av dem noen bestemte svar, og krever videre arbeid. Her er noen av problemene man møter:

- antall tilgjengelige pasienter er for få
- pasientene har ofte vært syke så lenge, eller vært behandlet så lenge, at man regner med at disse to forholdene kan ha ført til de endringene vi ser i peptidkonsentrasjonen.
- Schizofreni er fortsatt er kun en klinisk diagnose basert på en rekke ulike symptomer. Diagnosen må derfor inntil videre betraktes som en "sekke-diagnose". Bare på grunnlag av symptomene kan man begynne å inndeles Schizofreni i flere former, for eksempel Hebefren, Paranoid, Kataton. Sannsynligvis kan vi inndeles Schizofreni i flere subgrupper også etiologisk. Dette vil gjøre det vanskelig å finne den etiologiske forklaringen, da forsøk vil gi sprikende svar avhengig av hvilke type Schizofrene pasienter som var med! Dette er viktig å være oppmerksom sprikende resultater kan være et uttrykk for at Schizofreni består av flere subgrupper. Vi kan for eksempel inndeles pasientene i subgrupper basert på "peptid-speilet" i deres urin (Cade og medarbeidere 1999). Akkurat slik har noen pasienter økt tarmpermeabilitet, mens andre ikke har det (Wood og medarbeidere 1987). Ideen bør likevel ikke forkastes, for det viser seg allerede med denne begrensede mengde kunnskap at dette kan ha behandlingsmessige konsekvenser; de pasientene som viste seg å ha økt tarmpermeabilitet, var de samme som var satt på kun nevroleptika behandling, i motsetning til de andre undersøkte pasientene men som i tillegg fikk anticholinergika.

Dohans hypotese har siden 1966 utviklet seg til å omfatte flere diagnoser, både psykiatriske og nevrologiske. Bla. er det ved Autisme påvist ganske klart at noen av pasientene har økte peptider i urinen. Ved dialyse og gluten- /melkefri-diett hos disse pasientene, viser det seg at mengden av peptider minsker, og de får en reduksjon av symptomene (Reichelt og Knivsberg 2003, Knivsberg og medarbeidere 1995, Knivsberg og medarbeidere 2002, Knivsberg og medarbeidere 2003) Andre diagnoser hvor man mistenker at matintoleranse kan være en del

av årsaksbildet er ALS, MS, ulike epilepsi former og Depresjon. Selv om foreløpige forsøk er i startfasen, peker de i retning av at dette kan stemme.

HENSIKT

Problemstillingen for oppgaven er:

- Er det økt konsentrasjon av peptider i urinen til ubehandlede Schizofrene pasienter, i forhold til normalbefolkningen?
- I tilfelle; er det noe sammenheng mellom peptidkonsentrasjon og alvorlighetsgrad av lidelsen?
- Hvilke peptider er økt?
- Er det noen korrelasjon mellom spesifikke peptider og spesifikke symptomer?

METODE

Innhenting av uriner

Får å få pasienter til undersøkelsen kontaktet vi sykehus i Oslo-området, bla. seksjoner som under Ullevål, Aker, Akershus og Bærum Sykehus. Kun Akershus sa seg villig til å kontakte oss hvis de fikk pasienter med ikke-behandlet Schizofreni.

I mellomtiden søkte vi til Regional Etisk Komite – Region Sør, hvor det ble flere runder med søknader. Da vi endelig kom igjennom, var det ny avd. Overlege på Akershus. Han sa seg villig til å bidra med pasienter i første omgang, men trakk seg senere.

Deretter ble det avgjort at vi skulle forsøke å hente uriner fra Pakistan. Det var to grunner til dette; det er større mulighet for å treffe ubehandlede Schizofrene pasienter, og en medarbeider, Dr. Nasir Abbas, hadde kontakter i Psykiatriske sykehus i Pakistan, som sa seg villig til å bidra med pasient-uriner. Dr. Nasir Abbas ble tilkalt når sykehusene fikk en aktuell pasient. De involverte sykehus er; Service Hospital Lahore og Jinnah Hospital Lahore.

Han fikk en urinprøve, samt mulighet til innsyn i pasientens sykehistorie og klinikk. Han fikk totalt 10 uriner. Hver prøve bestod av 10ml morgenurin, som ble fryst ned omgående. 3 av pasientene er kvinner, 7 er menn.

Urinprøvesvar på 96 antagelig friske mennesker ble brukt som sammenligningsgrunnlag. Av disse er ca 50 % menn og 50 % kvinner. Dette var foreldre til autistiske barn, som selv fremstod som klinisk friske.

Klinisk informasjon

Pasientenes kliniske detaljer ble registrert på fastsatt skjema. Disse inneholdt alder, lidelsens varighet, om symptomene opptrer akutt eller kronisk i på det aktuelle tidspunktet. Det ble også registrert om pasienten hadde noen av disse symptomene; manglende innsikt, hørselshallusinasjoner, mistenksomhet, affektavflating, stemmer, vrangforestillinger, tankehøytoppløsning, sosial tilbaketrekning, underaktivitet, få samtaler, få fritidsinteresser, motorisk treghet, overaktivitet, uvanlige ideer, depresjon, uvanlig atferd, uvanlige positurer og bevegelser, katatoni, voldelig atferd, dårlige måltidsvaner, sosialt ydmykende atferd, uvanlig seksuell atferd, suicidalforsøk, inkontinens.

Alvorlighetsgrad av pasientens lidelse ble gradert fra 1-5, der 1 er lav alvorlighetsgrad, og 5 er meget alvorlighetsgrad. Alvorlighetsgraden er bestemt utifra symptomer og varighet.

I et av tilfellene mangler kliniske detaljer, og en pasient hadde ikke sikker diagnose ved innleggelse. Pasienten med manglende kliniske detaljer har fått diagnosen Schizofreni av den lokale psykiater. Pasienten med usikker diagnose viste seg ved videre observasjon å ha Schizoaffectiv lidelse.

HPLC

High Pressure Liquid Chromatografi (HPLC) ble brukt til å finne evt. endrede peptidkonsentrasjoner, samt hvilke topper som dominerer. Buffer A består av 0,5 ml Trifluor-eddiksyre i 0,5 liter vann. Buffer B består av 0,5 liter Acetontriol, 75 ml vann, blandet med 0,5 ml Trifluoreddiksyre i 10 ml vann. Temp. på kolonnen er satt til 30grader C. Spekteret som kommer frem ved 215 nanometer bølgelengde i UV spekteret blir brukt i beregningene, og gjenspeiler oftest peptidbindingene. UV 280 nanometer ble også kontinuerlig registrert for å kunne regne ut forholdstallene 215/280 og avsløre uttalt aromatiske forbindelser (f eks antipsykotiske/antidepressive midler)

For å utligne effekten av ulike urinkonsentrasjoner pga ulik væske-inntaket, bruker man kreatininkonsentrasjonen i urinen til å bestemme hvor mye urin som skal analyseres. Kreatinin ble målt på klinisk kjemisk avdeling Rikshospitalet. Antall mikroliter som skal påføres kolonnen til HPLC er da gitt ved antall microliter som tilsvarer 250 nanomol kreatinin.

Totalpeptid beregnes av maskinen. De ulike toppene beregnes ved å dividere høyden av toppene med 2. Deretter blir tallet multiplisert med 0,8.(Forholdstall for å kunne sammenlikne med tidligere kjørte prøver) Selv om direkte målt areal er det mest korrekte tallet, er denne bergningsmåten brukt fordi det gir best sammenligningsgrunnlag med tidligere resultater hvor avansert integrering av toppene ikke var tilgjengelig.

Data beregning

Deretter ble totalkonsentrasjon av peptider sammenlignet i de to gruppene.

Etter HPLC var det lett å se at noen peptid-topper gikk igjen hos de syke. Også disse ble sammenlignet i de to gruppene.

SPSS ble brukt til å sammenligne friske versus syke. Da man ikke hadde grunnlag til å tro at variablene er normalfordelt i befolkningen, valgte man å kjøre ikke-parametrisk Mann-Whitney test på dataene.

Totalkonsentrasjon av peptidene ble sammenlignet med sykdommens alvorlighetsgrad hos de 10 pasientene ved å sette opp konsentrasjon mot alvorlighetsgrad av sykdommen. Sykdommene er gradert fra 1-5 av psykiater.

Under beregningene er det ikke tatt hensyn til kjønn da antall kvinnelige pasienter er for få til å kunne gi reelle svar.

Pasientenes symptomer vurderes i forhold til de ulike peptidtoppene for å finne en mulig sammenheng. Her velger man å se bort flere av symptomene på skjemaet fordi de er endogene og vanskelig å få klarhet i, samt at en del kan være lært atferd. Derfor ble 5 symptomer valgt ut til sammenligning med de ulike peptidene; hørselshallusinasjoner, sosial tilbaketrekning, under el overaktivitet, uvanlig atferd og positurer.

Identiteten til peptidene

Identiteten av peptidene i de ulike toppene kan utforskes via tre mekanismer; Spiking, beregning og sammenligning av forholdstallet UV215/UV280, og den mest eksakte massespektrometri. Spiking går ut på at man tilsetter det stoffet til urinprøven, som man regner med utgjør den aktuelle toppen. Hvis dette gir en forhøyning av toppen (kokromatografi), vil det tyde på at man var på rett spor. Men dette er ikke noe absolutt, da flere stoffer kan filtreres ut samtidig selv om de ikke er identiske. Derfor beregner man forholdstallet UV215/UV280 for toppen i den opprinnelige prøven, og toppen i Spiking-prøven. Når disse viser samme UV absorpsjon og ratio ved to bølgelengder er det økt sannsynlighet for at det er samme stoff. Siste metode er Massespektrometri, som gir oss total molekylstørrelse, og ved fragmentering (MS/MS) også strukturen av peptidene. Ikke minst vil substitusjoner kunne bli avslørt., Massespektrometri er den hittil sikreste metoden til identifikasjon av peptidene. Vi har bare kunnet kjøre dette "off line" enn så lenge.

Tidligere data

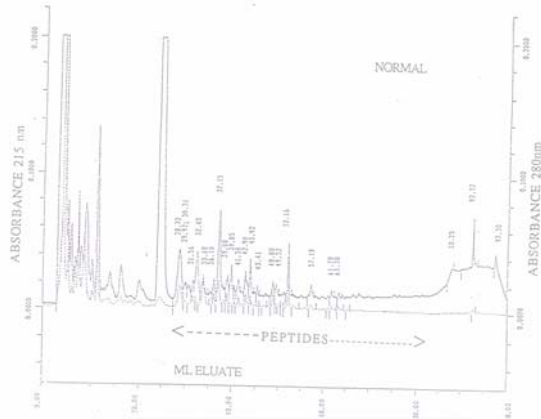
Man hadde da allerede noe informasjon tilgjengelig om de ulike toppene fra tidligere undersøkelser utført av K. L. Reichelt bla. vha massespektrometri. De ulike peptid-toppene er i de fleste tilfeller navngitt etter den angivelige strukturen etter Massespektrometrianalyse. Mange av disse undersøkelsene ble utført på eldre apparater, innebærer noe usikkerhet, og er foreløpig ikke fullt erkjent. Noen av peptid-toppene har vi ingen videre kjennskap til enn at de er tydelige hos våre pasienter.

IAG	Indolyl-3-acryloyglycine, øker angivelig tarm og membran-permeabiliteten
5HT	5HT= serotonin uptake stimulus
A4	Glutomorfin
A5	Glutomorfin
B5	Glutomorfin
C	Glutomorfin
CM14N	Casomorfin 1-4 Amid. Siden peptidet er amidert, trenger det angivelig lettere over Blod-Hjerne-Barrieren då det blir mer hydrofobt.
CMSUM	Summen av flere Casomorfiner, CM 1-3, CM 1-4, CM 1-4 Amid, CM 1-5, CM 1-5 Amid, CM 1-6, CM 1-7, CM1-8. Siden alle CM, unntagen CM1-4 Amid er mindre fremtredende, ble det valgt å slå disse sammen til en gruppe. Dette er antagelig alle nedbrytningsprodukter av Casomorfin, men har ulik lengde.
SUM-MORFIN	Summen av CMSUM og A4, A5, B5 og C, da alle mest sannsynlig er morfiner..
GM1	Gliadinomorfin
GM2	Gliadinomorfin
Topp - I	Ukjent peptid, men mest påvirket av gluten
Topp - II	Ukjent peptid, men mest påvirket av gluten
Topp - III	Ukjent peptid, men mest påvirket av gluten
P1	Ukjent peptid
HK	Ukjent peptid
80	Ukjent peptid
81	Ukjent peptid

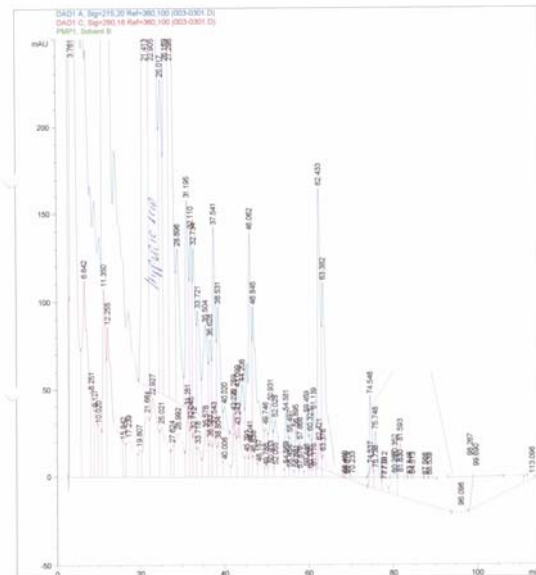
Sammenslåing av de ulike peptidene er mest interessant for sammenligning med de ulike symptomene.

RESULTAT

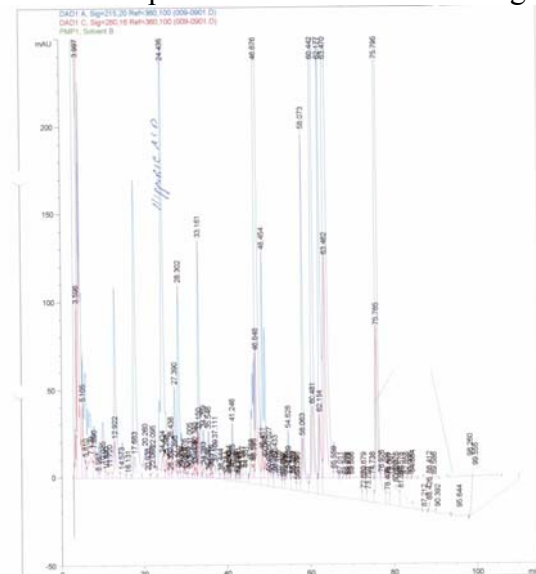
HPLC-svar på patienten med Schizoaffektiv viser seg å skille seg fra de resterende svarene:



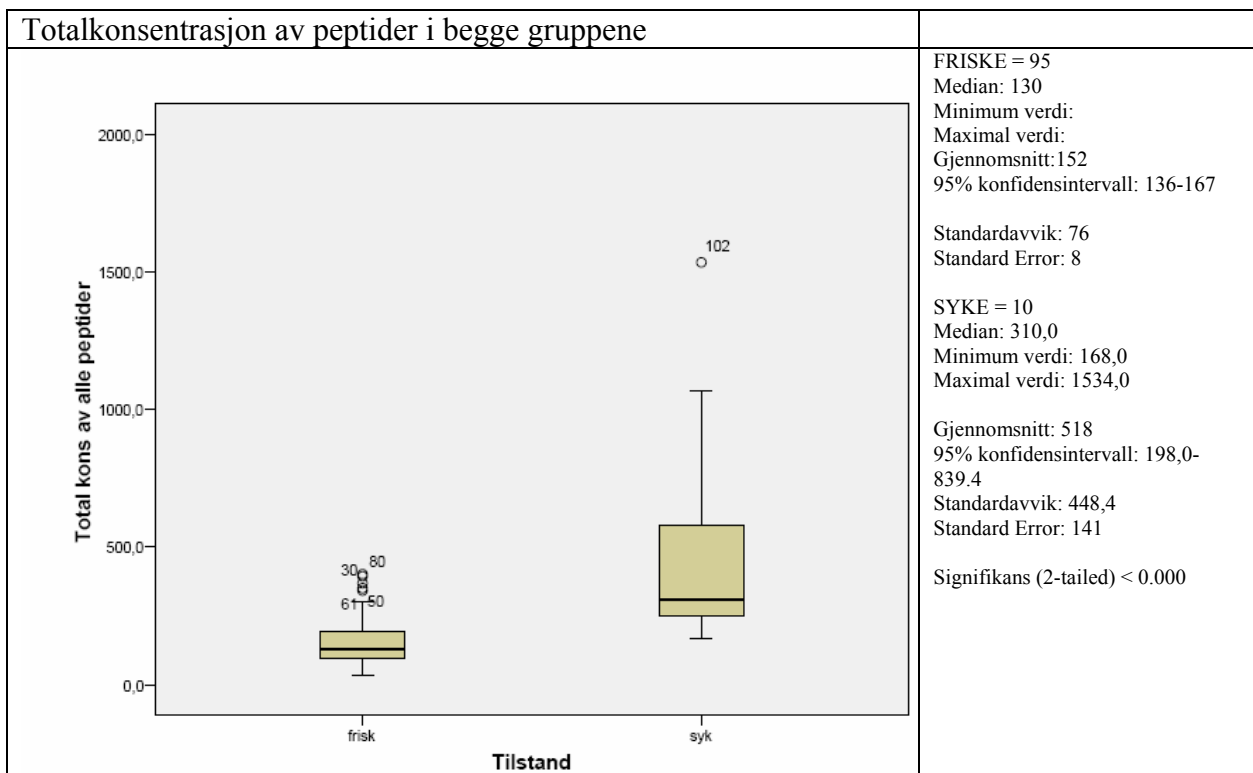
Urinprøve fra Friske



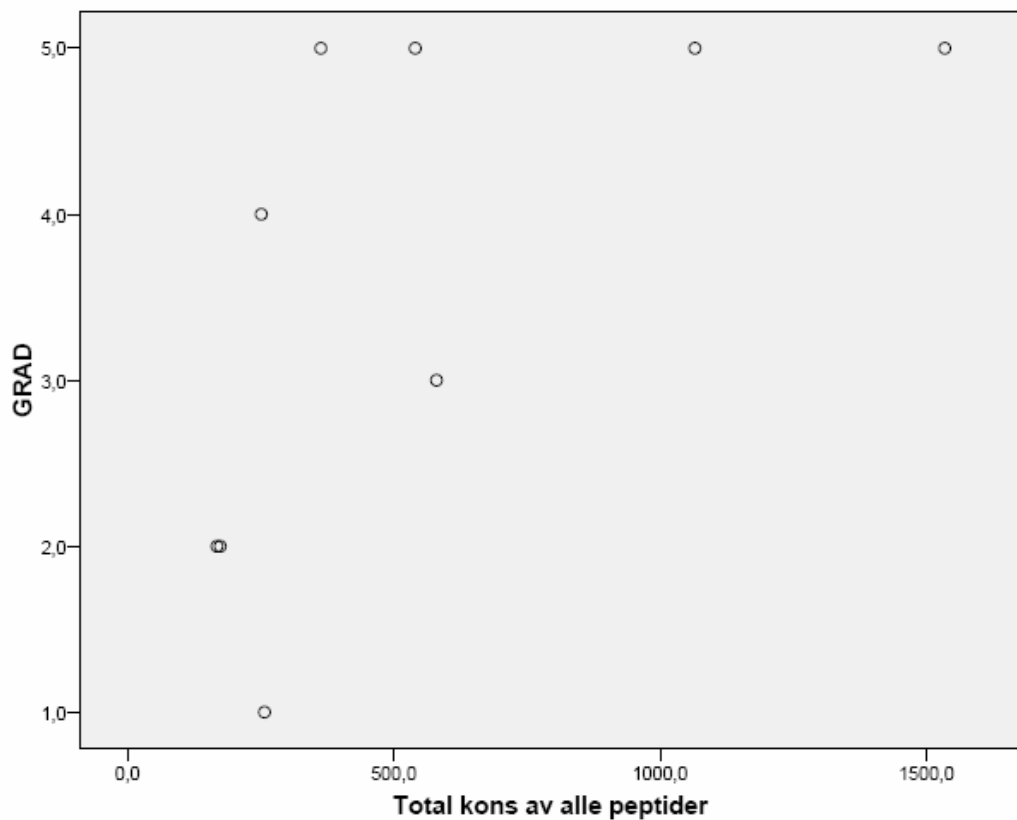
Samlet urinprøve for de 9 Schiofrene- og den Scizoaffective Pasienten

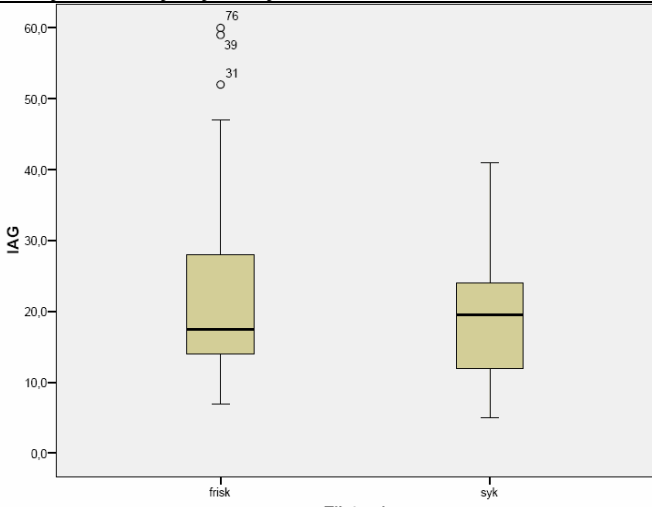
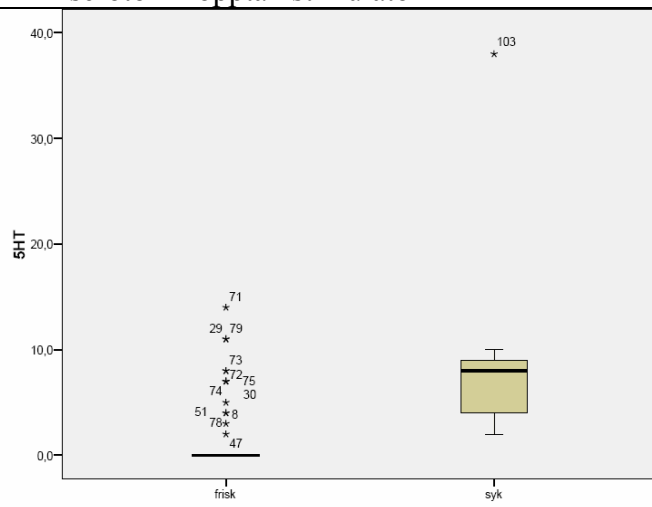
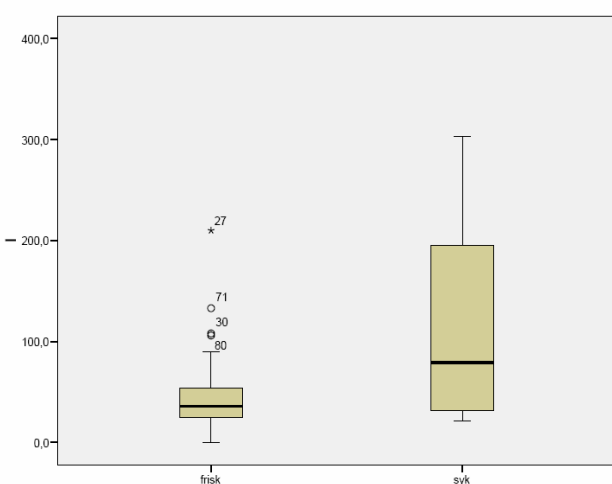


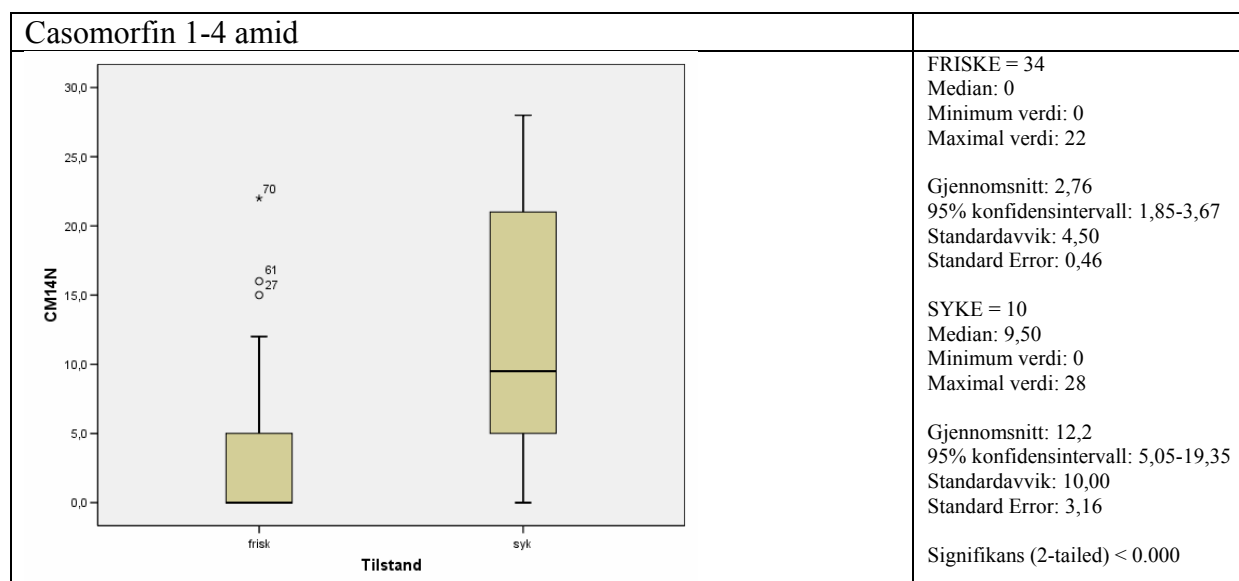
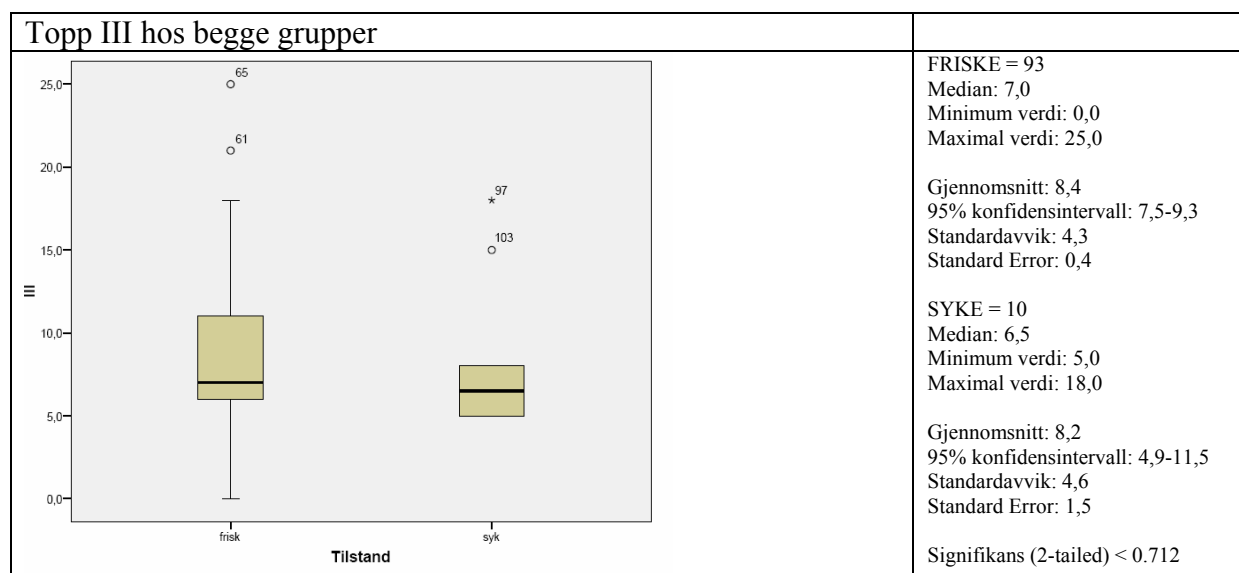
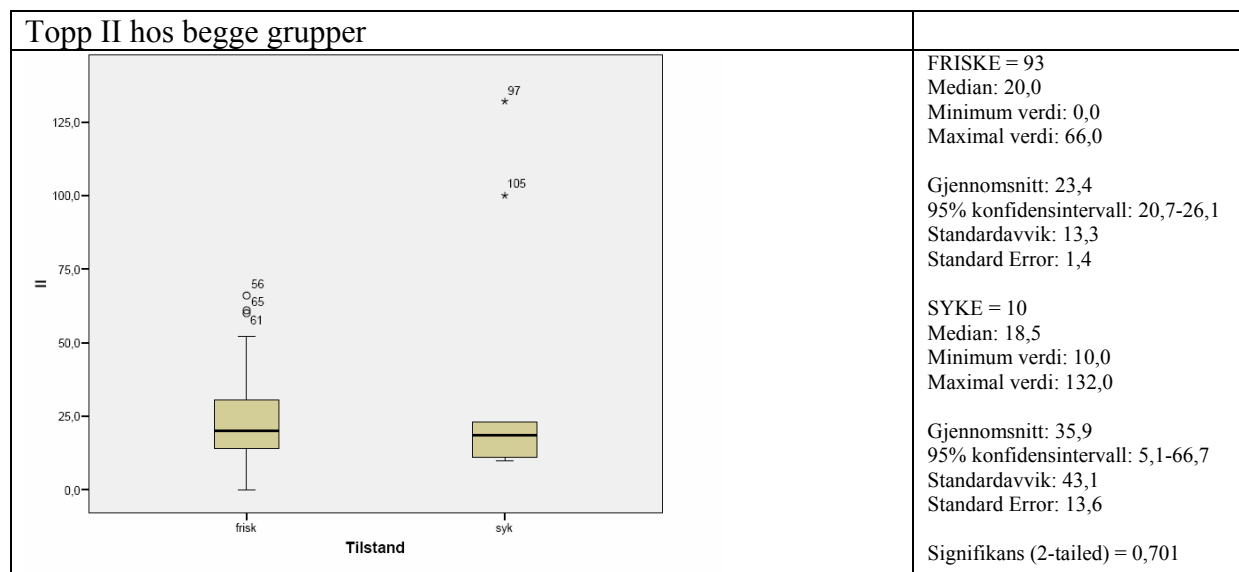
Urinprøven til pasient med Scizoaaffektiv Lidelse

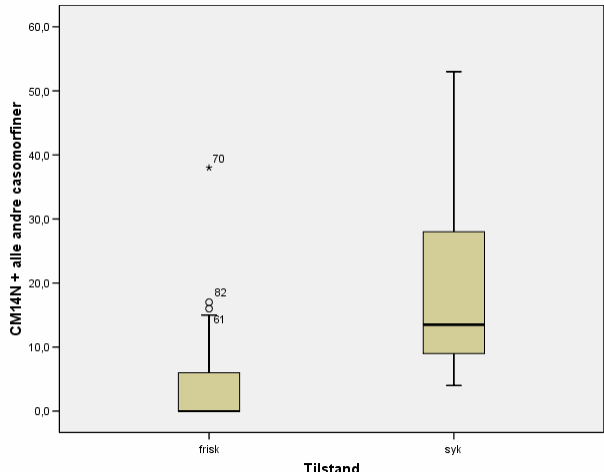


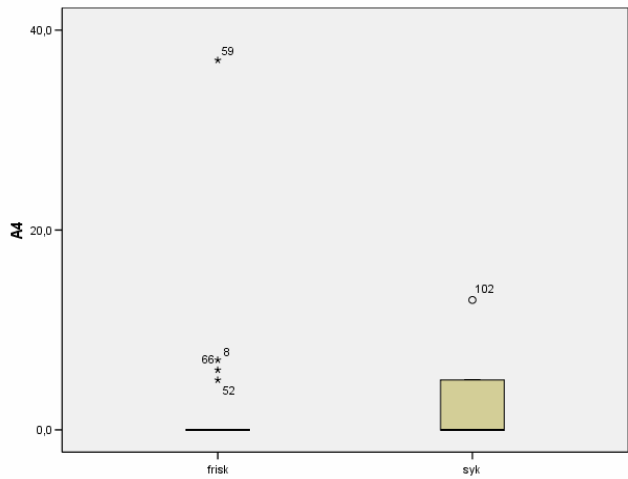
Sammenligning av alvorlighetsgrad av sykdommen, nummer 1-5, og totalkonsentrasjon av peptider.

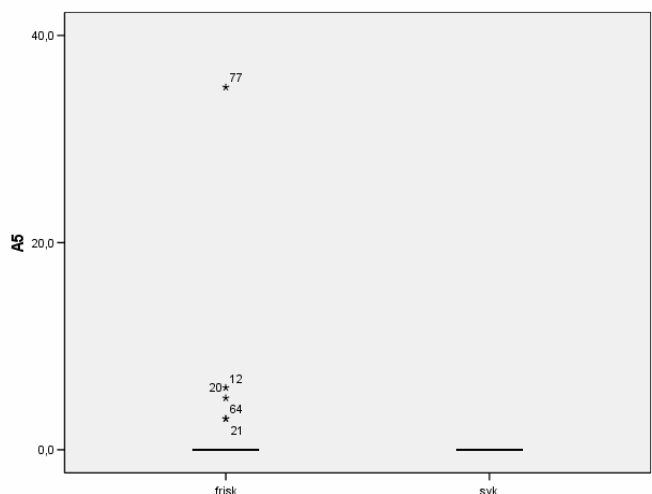


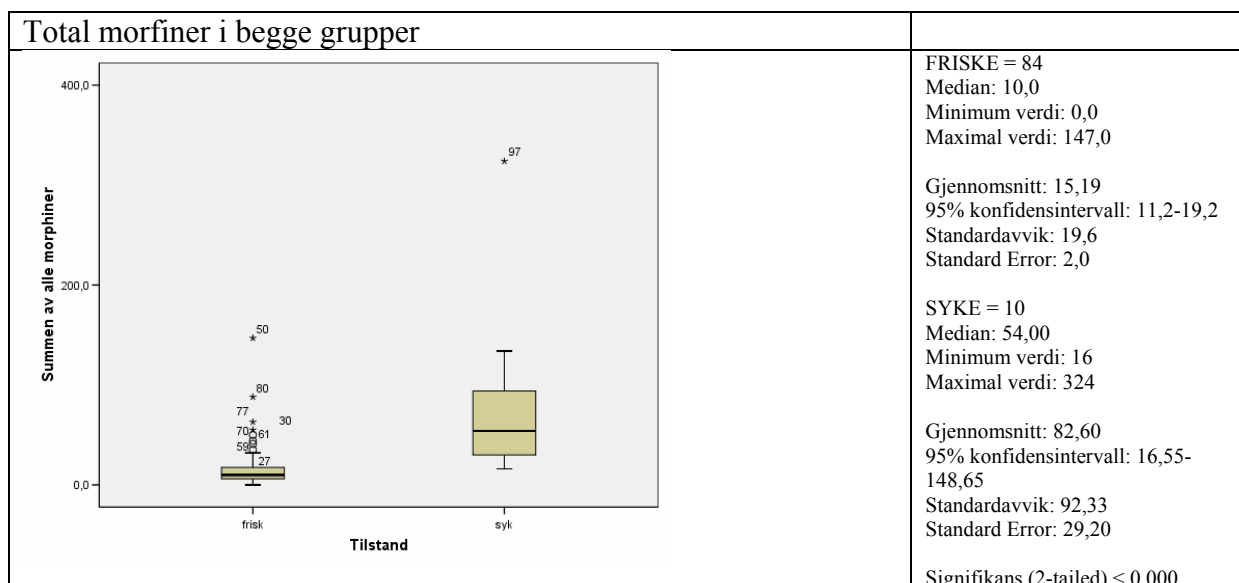
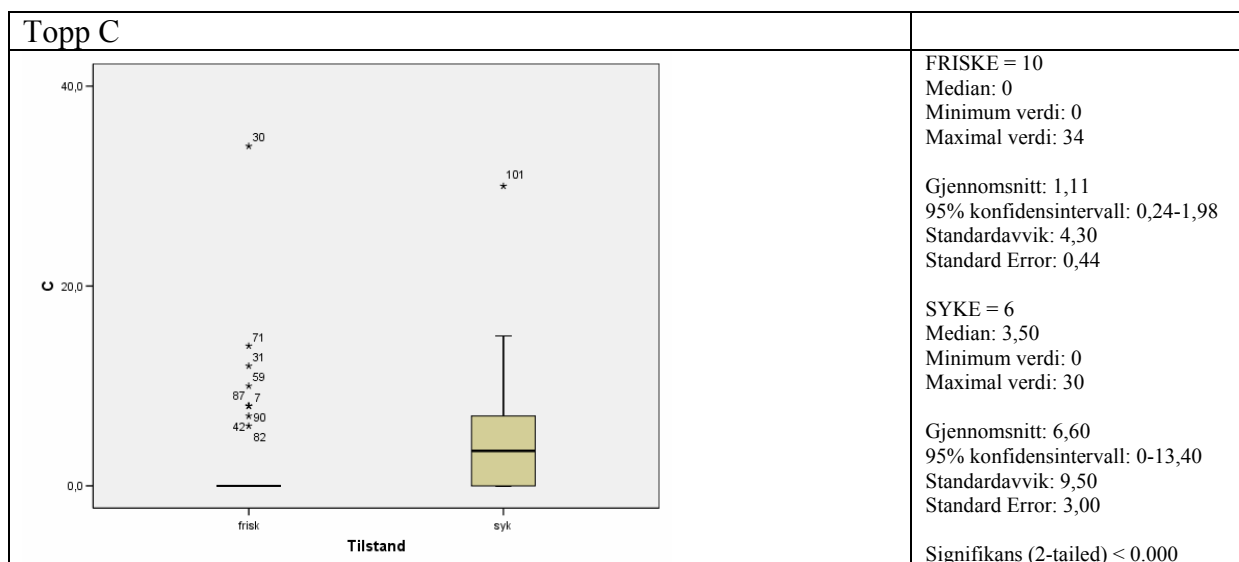
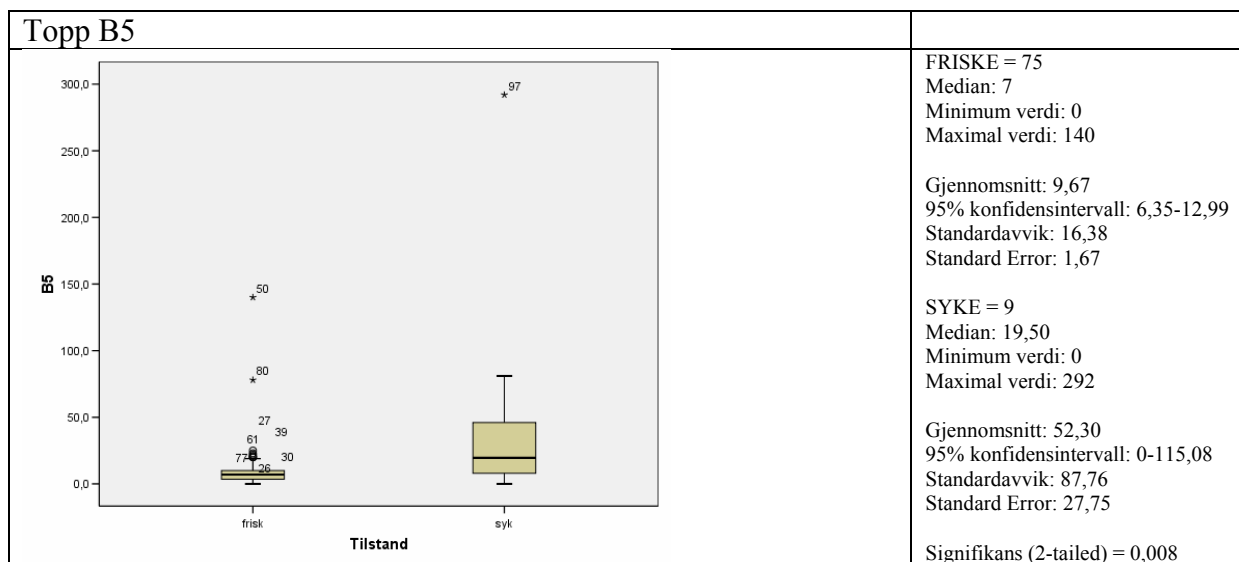
<p>Indolyl-3-Acryloyl Glysine</p>  <p style="text-align: center;">Tilstand</p>	<p>FRISKE = 95 Median: 17,5 Minimum verdi: 7,0 Maximal verdi: 60,0</p> <p>Gjennomsnitt: 21,9 95% konfidensintervall: 19,6-24,2 Standardavvik: 11,5 Standard Error: 1,2</p> <p>SYKE = 10 Median: 19,5 Minimum verdi: 5,0 Maximal verdi: 41,0</p> <p>Gjennomsnitt: 19,5 95% konfidensintervall: 11,4-27,6 Standardavvik: 11,3 Standard Error: 3,6</p> <p>Signifikans: 0,615</p>
<p>5-HT serotonin opptak stimulator</p>  <p style="text-align: center;">Tilstand</p>	<p>FRISKE = 13 Median: 0,0 Minimum verdi: 0,0 Maximal verdi: 14,0</p> <p>Gjennomsnitt: 0,9 95% konfidensintervall: 0,4-1,5 Standardavvik: 2,7 Standard Error: 0,3</p> <p>SYKE = 10 Median: 8,0 Minimum verdi: 2,0 Maximal verdi: 38,0</p> <p>Gjennomsnitt: 9,9 95% konfidensintervall: 2,6-17,2 Standardavvik: 10,2 Standard Error: 3,2</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.000</p>
<p>Topp I hos begge grupper</p>  <p style="text-align: center;">Tilstand</p>	<p>FRISKE = 93 Median: 36,0 Minimum verdi: 0,0 Maximal verdi: 210,0 Gjennomsnitt: 41,3 95% konfidensintervall: 35,3-47,2</p> <p>Standardavvik: 29,3 Standard Error: 3,0</p> <p>SYKE = 10 Median: 79,0 Minimum verdi: 21,0 Maximal verdi: 303,0</p> <p>Gjennomsnitt: 122,4 95% konfidensintervall: 45,9-199,0 Standardavvik: 107,0 Standard Error: 33,8</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.009</p>

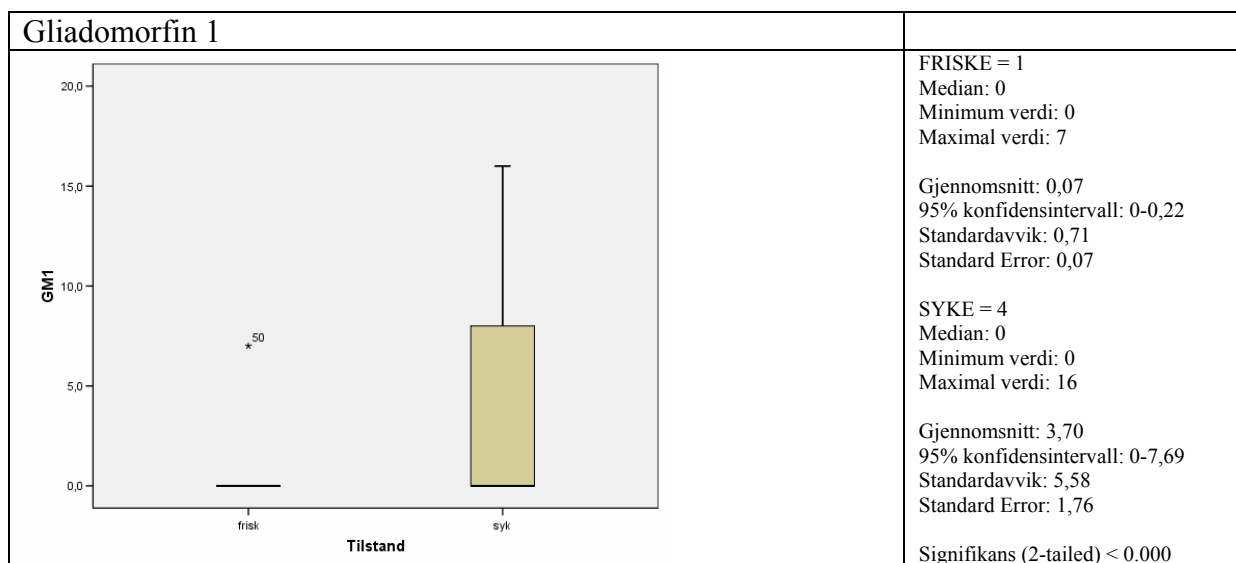
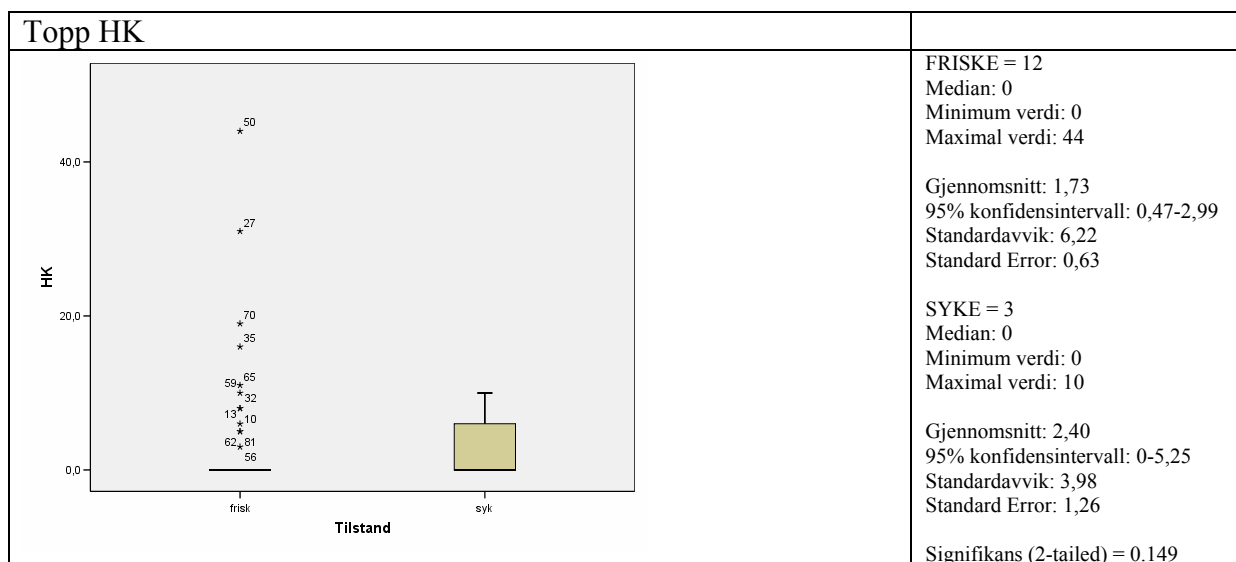
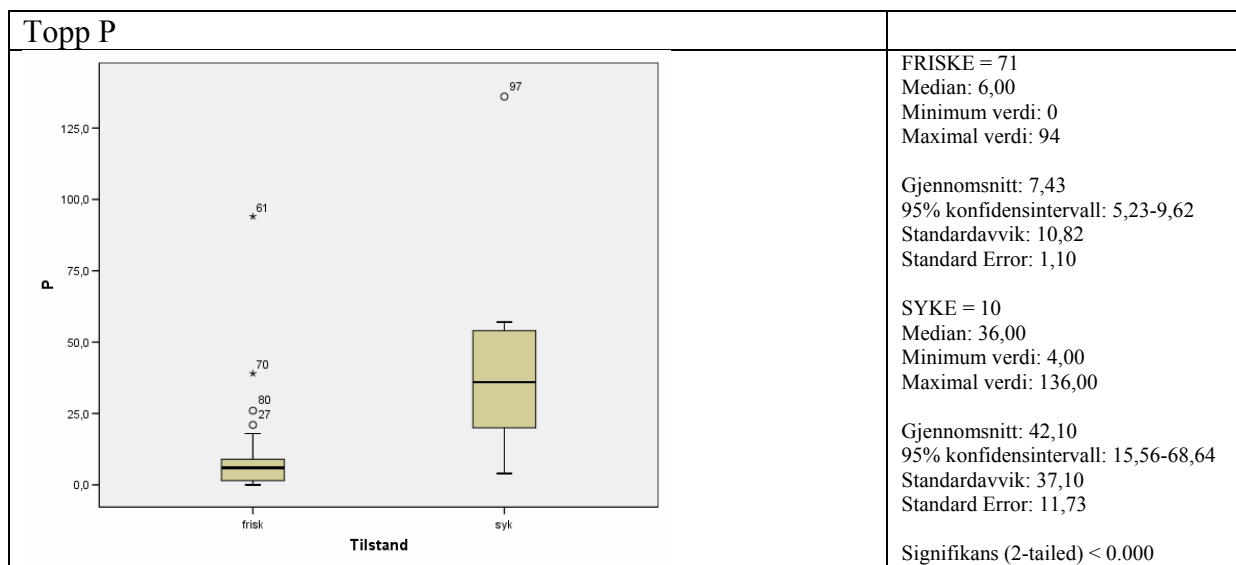


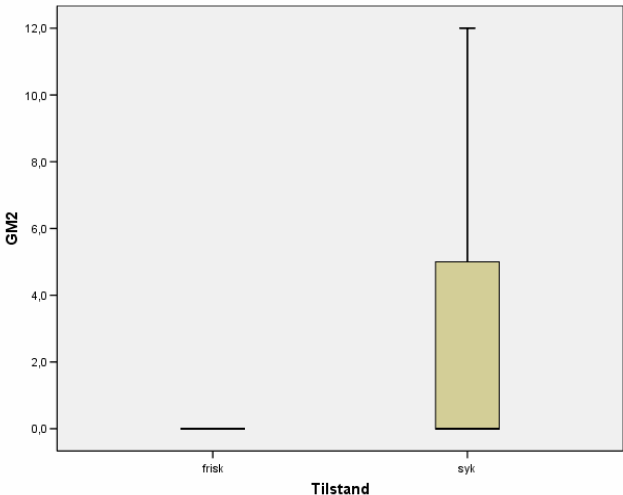
Summen av alle Casomorfiner	
 <p>CM14N + alle andre casomorfiner</p> <p>Tilstand</p>	<p>FRISKE = 34 Median: 0 Minimum verdi: 0,0 Maximal verdi: 38,0</p> <p>Gjennomsnitt: 3,3 95% konfidensintervall: 2,12-4,47 Standardavvik: 5,81 Standard Error: 0,59</p> <p>SYKE = 10 Median: 13,5 Minimum verdi: 4 Maximal verdi: 53</p> <p>Gjennomsnitt: 21,00 95% konfidensintervall: 7,87-34,13 Standardavvik: 18,35 Standard Error: 5,80</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.000</p>

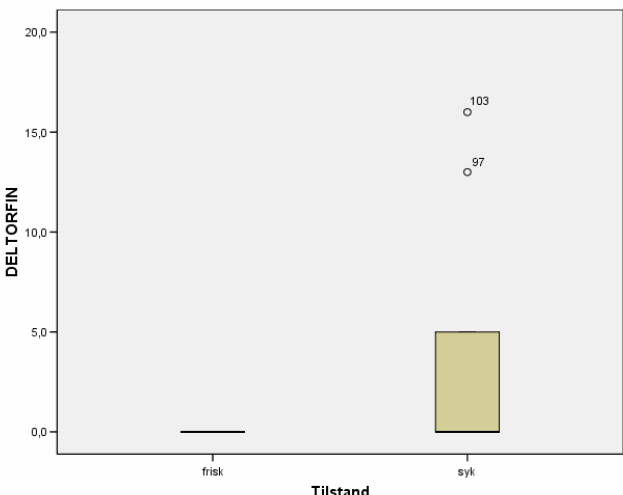
Topp A4	
 <p>A4</p> <p>Tilstand</p>	<p>FRISKE = 4 Median: 0 Minimum verdi: 0 Maximal verdi: 37</p> <p>Gjennomsnitt: 0,57 95% konfidensintervall: 0-1,36 Standardavvik: 3,90 Standard Error: 0,40</p> <p>SYKE = 4 Median: 0 Minimum verdi: 0 Maximal verdi: 13</p> <p>Gjennomsnitt: 2,7 95% konfidensintervall: 0-5,74 Standardavvik: 4,24 Standard Error: 1,34</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.000</p>

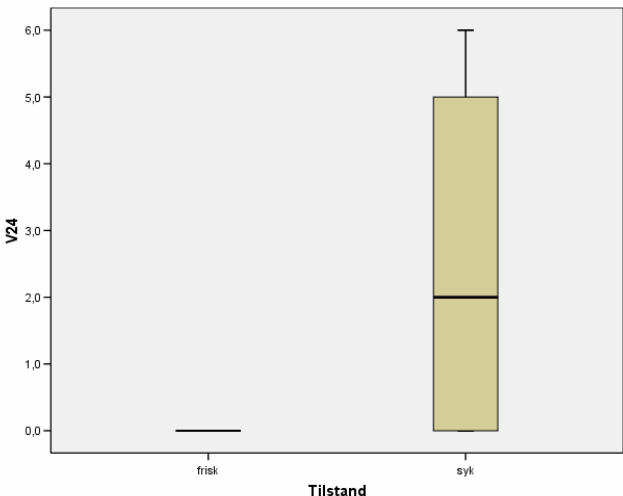
Topp A5	
 <p>A5</p> <p>Tilstand</p>	<p>FRISKE = 5 Median: 0 Minimum verdi: 0 Maximal verdi: 35</p> <p>Gjennomsnitt: 0,54 95% konfidensintervall: 0-1,28 Standardavvik: 3,66 Standard Error: 0,37</p> <p>SYKE = 0 Median: Minimum verdi: Maximal verdi:</p> <p>Gjennomsnitt: 95% konfidensintervall: - Standardavvik: Standard Error:</p> <p>Signifikans (2-tailed) = 0,462</p>

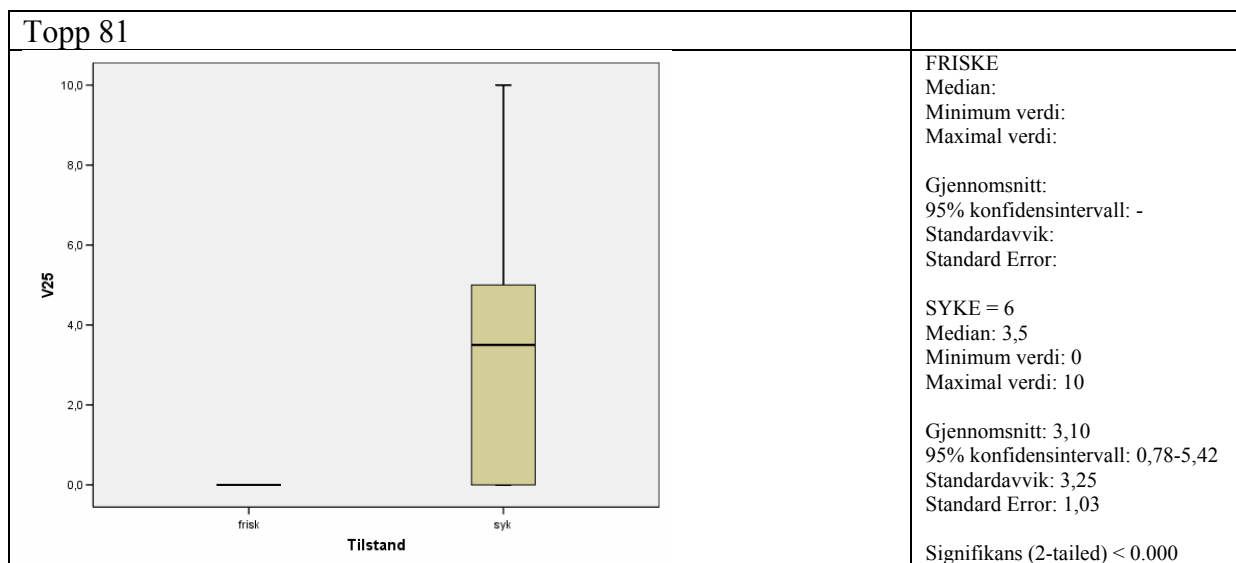




Gliadomorfin 2	
 <p>Tilstand</p>	<p>FRISKE Median: Minimum verdi: Maximal verdi:</p> <p>Gjennomsnitt: 95% konfidensintervall: - Standardavvik: Standard Error:</p> <p>SYKE = 4 Median: 0 Minimum verdi: 0 Maximal verdi: 12</p> <p>Gjennomsnitt: 2,70 95% konfidensintervall: 0-5,60 Standardavvik: 4,06 Standard Error: 1,28</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.000</p>

Deltorfin	
 <p>Tilstand</p>	<p>FRISKE Median: Minimum verdi: Maximal verdi:</p> <p>Gjennomsnitt: 95% konfidensintervall: - Standardavvik: Standard Error:</p> <p>SYKE = 4 Median: 0 Minimum verdi: 0 Maximal verdi: 16</p> <p>Gjennomsnitt: 3,80 95% konfidensintervall: 0-8,08 Standardavvik: 5,98 Standard Error: 1,89</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.000</p>

Topp 80	
 <p>Tilstand</p>	<p>FRISKE Median: Minimum verdi: Maximal verdi:</p> <p>Gjennomsnitt: 95% konfidensintervall: - Standardavvik: Standard Error:</p> <p>SYKE = 5 Median: 2 Minimum verdi: 0 Maximal verdi: 6</p> <p>Gjennomsnitt: 2,50 95% konfidensintervall: 0,58-4,41 Standardavvik: 5,68 Standard Error: 0,85</p> <p>Signifikans (2-tailed) < 0.000</p>



	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hørsels- hallusinasjoner	X	X	X		X	X	X	X	X
Sosial tilbaketrekning	X	X	X	X	X	X			
Underaktivitet	X			X	X				
Overaktivitet		X				X	X	X	X
Uvanlige bevegelser og positurer								X	

DISKUSJON

Første synlige resultat var peptid-speilet hos pasienten med Schizoaffectiv lidelse. Her var det helt tydelig flere topper enn hos de resterende pasientene. Blant annet har han en del ukjente topper som opptrer sent under HPLC, og som ikke opptrer hos de resterende pasientene. Dette kan være en indikasjon på at de ulike lidelsene kommer som et resultat av at ulike peptider sirkulerer i kroppen.

Videre fant vi at det er en høyst signifikant forskjell på totalpeptid hos de friske og de syke. Samt noe sammenheng mellom total-peptid og alvorlighetsgrad av lidelse, men denne er ikke absolutt, slik det fremgår av grafen. (Antagelig fordi antall pasienter er for lite)

Når det gjelder de ulike toppene, ser man at topp II og III, svært overraskende også IAG, A5 og HK1, viser ingen signifikant forskjell mellom de to gruppene. Derimot er det signifikant forskjell ved sammenligning av de resterende toppene.

Man ser at IAG, topp I, II og III ses hos tilnærmet alle individer. Den signifikante forskjellen for topp I utgjøres trolig av høyden på toppene.

Topp B5 og P finnes hos en god del friske (ca. 75 %) men tilnærmet alle syke, og her gjelder noe av det samme som for topp I.

Casomorfiner opptrer hos tilnærmet 30 % av normale uriner, men hos samtlige syke. Her bidrar nok både tilstedeværelse, og høyden av toppen til den signifikante forskjellen.

5HT, opptrer hos svært få friske, og samtlige syke, og tilstedeværelsen er nok den dominerende faktor til den signifikante forskjellen. I likhet med dette finnes toppene GM1, GM2, deltorfin, topp 80 og 81 praktisk talt hos ingen friske, men like i underkant av halvparten av de syke. Her består den signifikante forskjellen trolig i tilstedeværelsen av peptidene, og man kan muligens ane at tilstedeværelsen av disse må være patogen. Flere av disse har også overlappende fremtreden hos de samme pasientene.

Topp A5 ses kun hos noen få individer, og alle disse er friske. Tilstedeværelsen av peptidet utgjør ingen signifikant forskjell.

Sammenslåingen av alle Casomorfinene gir større signifikans enn CM14N alene, mens summen av alle morfinene havner imellom disse verdiene. Dette kan tyde på at Casomorfinene muligens er mer potente enn de resterende morfinene.

Det ble gjort et forsøk på å sammenligne ulike symptomer med ulike peptid-topper, men det viste seg imidlertid at det var lite å få ut av dette. Flere av symptomene og peptidene er overlappende, og det ble derfor vanskelig å få noe ut av det lille antall pasientdata vi hadde. Samtidig er vanskelig å sette cut-off for patologi på de peptider som har glidende overgang fra normal til patologi, eller som finnes hos alle syke.

KONKLUSJON

Forsøket viser en klar forskjell i totalpeptider i urinen til Schizofrene pasienter sammenlignet med antagelig friske. Man ser også tendenser til at alvorlighetsgraden av lidelsen kan ha sammenheng med totalpeptider i urinen.

Toppene I, 5HT, A4, B5, C, P, Casomorfiner, HK, GM1, GM2, Deltorfin, topp 80 og 81 viser signifikant forskjell mellom gruppene friske og Schizofrene. Av disse fremkommer den signifikante forskjellen for Topp I helt klart som et resultat av høyere topper hos de syke. GM1, GM2, deltorfin, topp 80 og 81 er derimot helt klart patologiske topper, hvor den signifikante forskjellen fremkommer pga tilstedeværelsen av toppene hos de syke.

Topp II, III, IAG, A5 og HK viser ingen signifikant forskjell.

Det er foreløpig vanskelig å se noen sammenheng mellom ulike symptomer og peptider.

Videre forsøk bør gjøres for evt. å bekrefte resultatene, da antall pasienter i forsøket er relativt få. Samt bør det forsøkes å få klarhet i om det er mulig å sette grenser for hva som er patologiske og normale peptidkonsentrasjoner totalt og for de ulike toppene. Deretter for å sammenligne dette med de ulike symptomene. Siden foreløpige massespektrometri-resultater er uferdige, bør det utføres ytterligere forøk på de toppene som viser signifikant forskjell mellom de ulike gruppene.

LITTERATUR

- Cade, R., Privette, M., Fregly, M., Rowland, N., Sun, Z., Zele, V., Wagemaker, H., and Edelstein, C. (1999)
Autism and Schizophrenia: Intestinal Disorders.
Nutritional Neuroscience 3:57-72
- Chabance, B., Marteau, P., Rambaud, J. C., Migliore-Samour, D., Boynard, M., Perrotin, P., Guillet, R., Jolles, P., and Fiat, A. M. (1998)
Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yoghurt.
Biochemie 80: 155-165
- Crow, T. J. (1994)
Aetiology of schizophrenia.
Current opinion in psychiatry 7:39-42
- Dohan, F. C. (1966)
Cereals and Schizophrenia. Data and Hypothesis.
Acta Psychiatry Scandinavia 42: 125-152
- Drysdale, A., Deacon, R., Lewis, P., Olley, J., Electricwala, A. and Sherwood R. (1982)
A peptide-containing fraction of plasma from Schizophrenic patients which binds to opiate receptors and induces hyper-reactivity in rats. Neuroscience 7:1567-1574
- Eaton, W., Mortensen, P.B., Agerbo, E., Byrne, M., Mors, O. and Ewald H. (2004)
Coeliac disease and schizophrenia: population based case control study with linkage of Danish national registers
BMJ; 328: 438-439
- Ermisch, A., Ruhle, J., Neubert, K., Hartrodt, B., and Landgrave, R. (1983)
On the blood-brain barrier to peptides : (3H) beta casomorphin-5 uptake by eighteen brain regions in vivo
Neurochem 41: 1229-1233
- Hole, K., Bergslien, A. A., Jørgensen, H., Berge, O-G., Reichelt, K. L., and Trygstad, O. E. (1979)
A peptide containing fraction from schizophrenia which stimulates opiate receptors and inhibits dopamine uptake
Neuroscience 4: 1139-1147
- JM Eagles (1991)
The relationship between schizophrenia and immigration. Are there alternatives to psychosocial hypothesis?
British Journal of Psychiatry 159: 783-789
- Idet, M., Grof, J., Menyhart, J. And Pajor, A. (1982)
Elevated opioid activity in sera of chronic schizophrenics
Acta Physiol Hung 60: 121-127
- Kendler, K.S. and Diels, S.R. (1993)
The genetics of schizophrenia: A current , genetic-epidemiologic perspective.
Schizophrenia Bulletin 19:216-285
- Knivsberg, A.-M., Reichelt, K.L., Høien, T. and Nødland, M. (2002)
A randomised, Controlled study of dietary intervention in autistic syndromes
Nutritional Neuroscience;5(4): 215-261
- Knivsberg, A.-M., Reichelt, K.L., Høien, T. and Nødland, M. (2003)
Effect of a dietary intervention on autistic behavior.
Focus on autism and other developmental disabilities;18;4:247-256
- Knivsberg, A.-M., Reichelt, K.L., Nødland, M. and Høien, T (1995)
Autistic syndromes and diet: a follow up study
Scandinavian journal of educational research;39;3:223-236

- Kringlen, E. (1964)
Schizophrenia in male monozygotic twins.
Acta Psychiatrica Scandinavica 178: 1-76
- Kringlen, E and Cramer, G (1989)
Offspring of monozygotic twins discordant for schizophrenia
Acta Psychiatrica Scandinavica 46: 873-877
- Lindstrøm, L. H. , Besev, G., Gunne, L-M. and Terenius, L. (1986)
CSF levels of receptor-active endorphine in schizophrenic patients: correlation with symptomatology and monoamine metabolites
Psychiat. Res. 19: 93-100
- Lorenz, K. (1990)
Cereals and Schizophrenia.
Advances in cereal science and technology, X:435-469
- Mahe, S., Tome, D., Dumontier, A. M., and Deseaux, J. F. (1989)
Absorption of intact morphiceptin by diisopropylfluorophosphate-treated rabbit ileum
Peptides 10: 45-52
- Onstad, S., Skre, I., Torgersen, S and Kringlen, E (1991)
Twin concordance for DSM-III R schizophrenia.
Acta Psychiatrica Scandinavica 83: 395-401
- Pratesi, R., Gandolfi, L., Friedman, H., Farage, L., de Castro, C.A. and Catassi, C. (1998)
Serum IgA antibodies from patients with coeliac disease react strongly with human brain blood-vessel structures.
Scandinavian Journal of Gastroenterology August;33(8):817-821
- Reichelt, K. L. and Landmark, J. (1995)
Specific IgA antibody increases in schizophrenia
Biol. Psych. 37: 410-413
- Reichelt, K.L., Seim, A.R., and Reichelt W.H. (1996)
Could schizophrenia be reasonably explained by dohans hypothesis on genetic interaction with a dietary peptide overload?
Progressiv Neuro-psychopharmacological and biological psychiatry;20:1083-1114
- Reichelt, K.L. and Knivsberg A.-M. (2003)
Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides?
Nutritional Neuroscience; 6:19-28
- Root, A. W., Retter, E. D. and Duckett, G. K. (1977)
Urinary excretion of immunoreactive gonado-tropin releasing hormone like material in prepubertal and pubertal children
Clin Endocrinal Metab 44: 909-914
- Sun, Z., Cade, J.R., Fregly, M.J. and Privette, R.M. (1999a)
 β -casomorphin induces fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia an autism.
Autism 3(1):67-83
- Sun, Z. And Cade, J.R. (1999b)
A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioral changes in rats.
Autism 3(1):85-95
- Wood, N.C., Hamilton, I., Axon, A.T., Khan, S.A., Quirke, P., Mindham, R.H., McGuigan, K. and Prison, H.M. (1987)
Abnormal intestinal permeability. An aetiological factor in chronic psychiatric disorders?
British Journal of Psychiatry 150: 853-856.